

13jan04 16:21:58 User156068 Session D572.1  
Sub account: 41714.0005/GORTL

File 351:Derwent WPI 1963-2004/UD,UM &UP=200402  
(c) 2004 Thomson Derwent

1/34/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010039483 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1994-307194/ 199438

Blood purificn. substances for treatment of diseases or sepn. of blood components - comprises organic cpd. fixed to substance to be absorbed via hydrophilic spacer having aldehyde base at both ends

Patent Assignee: TOYOCO KK (TOYM )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6233816	A	19940823	JP 9324272	A	19930212	199438 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9324272 A 19930212

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6233816	A		11 A61M-001/36	

Abstract (Basic): JP 6233816 A

Purifier is made by introducing polycarbonic acid of MW 400-40000 into the water-insol. unwoven cloth carrier comprising fibre of 0.1-100 microns dia. to attain carboxyl base 10-10 power4 micro tg/g., fixing the organic cpd. similar to the substance to be absorbed by the hydrophilic spacer having aldehyde base at both ends, and comprises polyalkylene oxide structure.

Polycarbonic acid is pref. one of vinyl cpd. contg. carboxyl gp. e.g. acryl acid, benzoic- methacrylic-, maleic-, phthalic- or polyglutamic- or polyaspartic acid.

USE/ADVANTAGE - Blood purificn. substance is used for the treatment of diseases of the autoimmune disease, chronic rheumatism, cancer, high cholesterol etc., or for the sepn. of blood cell components. Dwg.0/1

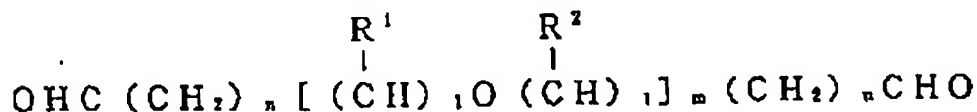
Derwent Class: A96; D22; J01; P34

International Patent Class (Main): A61M-001/36

1/IM/1

DIALOG(R)File 351:(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

C:\Program Files\Dialog\DialogLink\Graphics\65.bmp



File 347:JAPIO Oct 1976-2003/Sep(Updated 040105)  
(c) 2004 JPO & JAPIO

1/7/1  
DIALOG(R)File 347:JAPIO  
(c) 2004 JPO & JAPIO. All rts. reserv.  
04561916  
HEMOCATHARSIS ADSORBENT  
PUB. NO.: 06-233816 [ JP 6233816 A]  
PUBLISHED: August 23, 1994 (19940823)  
INVENTOR(s): YOKOTA HIDEYUKI  
SEKO MASAHIRO  
INAMORI KAZUNORI  
TANAKA MASAKAZU  
APPLICANT(s): TOYOBO CO LTD, JP (Japan)  
APPL. NO.: 05-024272 [JP 9324272]  
FILED: February 12, 1993 (19930212)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To provide a homocatharsis adsorbent having the blood compatibility causing no ill effects such as the coagulation of blood and the destruction or reduction of blood cell constituents when blood is directly perfused and having the adsorption capability and adsorption selectivity capable of adsorbing a specific constituent in blood selectively, simply, and effectively.

CONSTITUTION: The polycarboxylic acid having the molecular weight of 400-40,000 and the carboxyl group content of 10-10(sup 4).mu.eq/g is introduced into a water-insoluble nonwoven fabric type carrier made of fibers having the fiber diameter of 0.1-100.mu.m, and an organic compound having affinity for an adsorbed material is fixed to it via a hydrophilic spacer made of a polyalkylene oxide skeleton and having the aldehyde group at both terminals to obtain the objective hemocatharsis adsorbent.

File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat 1968-2003/UD=200402  
(c) 2004 EPO

DIALOG(R)File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat  
(c) 2004 EPO. All rts. reserv.  
11941039  
Basic Patent (No,Kind,Date): JP 6233816 A2 940823 <No. of Patents: 001>  
Patent Family:  
Patent No Kind Date Applic No Kind Date  
JP 6233816 A2 940823 JP 9324272 A 930212 (BASIC)  
Priority Data (No,Kind,Date):  
JP 9324272 A 930212

#### PATENT FAMILY: JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 6233816 A2 940823  
HEMOCATHARSIS ADSORBENT (English)  
Patent Assignee: TOYO BOSEKI  
Author (Inventor): YOKOTA HIDEYUKI; SEKO MASAHIRO; INAMORI KAZUNORI;  
TANAKA MASAKAZU  
Priority (No,Kind,Date): JP 9324272 A 930212  
Applic (No,Kind,Date): JP 9324272 A 930212  
IPC: \* A61M-001/36  
CA Abstract No: \* 122(06)064436S; 122(06)064436S  
Derwent WPI Acc No: \* C 94-307194; C 94-307194  
JAPIO Reference No: \* 180610C000087; 180610C000087  
Language of Document: Japanese

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-233816

(43)公開日 平成6年(1994)8月23日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 M 1/36	3 3 3	9052-4C		

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 11 頁)

(21)出願番号	特願平5-24272	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成5年(1993)2月12日	(72)発明者	横田 英之 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
		(72)発明者	世古 政弘 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
		(72)発明者	稲森 和紀 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血液浄化吸着材

(57)【要約】

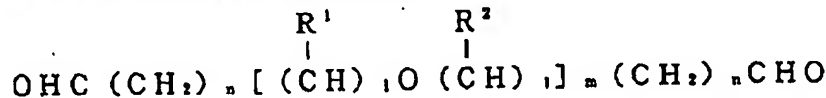
【目的】 血液を直接灌流することによって血液の凝固、血球成分の破壊、減少等の弊害を及ぼすことのない血液適合性を有し、血中の特定成分を選択的、簡便、且つ効果的に吸着することができる吸着能、吸着選択性を備えた血液浄化吸着材を提供する。

【構成】 繊維径0.1 $\mu$ m~100 $\mu$ mの繊維から成る水不溶性不織布型担体に、分子量400~40000のポリカルボン酸をカルボキシル基含量が10~10<sup>4</sup> meq/gとなるよう導入し、これに両末端にアルデヒド基を有し、ポリアルキレンオキサイド骨格から成る親水性スパーサーを介して、被吸着物質と親和性を有する有機化合物を固定化したことを特徴とする血液浄化吸着材。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体としての分子量400～40000のポリカルボン酸を導入した繊維径0.1～100 $\mu$ mの繊維から成る水不溶性不織布に、両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーを介して、被吸着物質と親和性を有する有機化合物を固定して成る血液浄化吸着材。

【請求項2】 担体表面におけるポリカルボン酸由来のカルボキシル基含量が10～10<sup>4</sup>  $\mu$ eq/gであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の血液浄化吸\*10



## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は自己免疫疾患（重症筋無力症、慢性リウマチ、特発性血小板減少性紫斑病など）、免疫関連疾患（気管支喘息、糸球体腎炎など）、癌（白血病など）、高脂血症などの治療、及び幹細胞、B細胞、T細胞など血中細胞成分の分離を目的とし、血液から血漿を分離することなく、直接血液を接触させることによって血中の特定成分を分離する血液浄化吸着材に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、免疫不全、腫瘍、高脂血症など治療には血漿交換法が有効とされ、広く行われている。しかしながら、この療法では血漿をすべて交換するため、（1）不要成分のみならず、必要な成分までも除去されてしまうこと、（2）除去した血漿に替えて体内に補充される血漿、あるいは血漿製剤が不足しているため、大量かつ持続的な入手が困難である、（3）血清肝炎やアレルギー、さらにはAIDS（後天性免疫不全症候群）感染の危険性があること、など血漿交換法が内含する問題は多い。

【0003】こういった状況を背景として、近年、病因関連物質の選択的除去による療法が盛んに行われるようになってきた。このような方法は例えば、メンブレンフィルターを用いるカスケード（Siebelth, H. G., Plasma Exchange, P. 29, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1980）、あるいは二重ろ過法（阿岸鉄三ら、腎と透析、10（3）、475、1981）、凍結ろ過法（L'Abatte A., et al., Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc., 14, 486, 1977）、塩析血漿処理法（大江宏明ら、人工臓器、140（1）、472-475（1985））が考案されている。

【0004】他の治療方法としては、各種薬剤の使用が行われているが、一般に副作用の危険性があり、使用

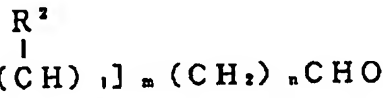
\*着材。

【請求項3】 両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーが、下記化1の構造を有する化合物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の血液浄化吸着材。化1において、

n=0～10の整数 m=2～400の整数 l=1または2

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は水素原子またはメチル基で、それぞれ同じもしくは異なってもよい。

【化1】



量、使用期間などに細心の注意を払う必要がある。

【0005】このような問題を解決できる治療法としては、自己の血液を浄化した後に再輸注する方法、すなわち、体外循環血液浄化法が望ましいとされる。この方法を探るにあたり、副作用がなく、自己の血液から病因物質を充分且つ選択的に除去することのできる浄化材及び血液浄化療法が望まれていた。

【0006】従来、この目的に供し得る血液浄化材としては、

（1）アフィニティー吸着材（例えば、特公平2-5096、特公平2-26988、特開平1-158970など）

（2）多孔性樹脂（例えば特開昭56-147710、特公昭62-2543、Rohm&Haas製の「アンバーライトXAD-7」など）

（3）イオン交換体（例えばカルボキシメチルセルロース、ジエチルアミノエチルアガロースなど）

（4）無機多孔体（例えば特公昭62-2543、多孔質ガラス、セラミクスなど）がある。

【0007】しかし、多孔性樹脂やイオン交換体は吸着能が小さい上に吸着特異性が低く、これを血液浄化材として用いると効果が充分でないばかりでなく、血中の必須成分までも吸着してしまう可能性があり、安全性の面でも問題がある。また、無機多孔体は吸着能、吸着特性については比較的良好であるが、未だ実用に供するには不十分であり、血液適合性に乏しいため、多量のヘパリンの添加が必要となり、出血傾向等の副作用が生じる。このような点から、将来的に最も可能性の大きいアフィニティー吸着材による有用な血液浄化材の開発が望まれている。

【0008】アフィニティー吸着材は、生物学アフィニティー吸着材（抗原抗体結合、補体結合、Fc結合等の生物学的相互作用で血液中の病因物質と結合し、これを吸着するもの）と物理化学的アフィニティー吸着材（静電結合、水素結合、ファンデルワールス力等物理的または化学的相互作用によって血液中の病因物質と結合し、これを吸着するもの）とに大別でき、さらに従来知られ

20

30

40

50

ている物理化学的アフィニティー吸着材は以下の6つに分類することができる。

(1) カルボキシル基またはスルホン酸基を表面に有する多孔体 (例えば、特開昭56-147710、特開昭57-56038、特開昭57-75141、特開昭57-170263、特開昭57-197294、)

(2) 疎水性アミノ酸が結合されている親水性担体 (例えば、特開昭57-122875、特開昭58-15924、特開昭58-165859、特開昭58-165861、旭メディカル製イムソーパー)

(3) その他疎水性低分子化合物が固定されている担体 (例えば特開平1-158970)

(4) 変性免疫グロブリン (IgG) が結合されている親水性担体 (例えば特開昭57-77624、特開昭57-77625、特開昭57-156035)

(5) メチル化アルブミンが結合されている多孔体 (例えば特開昭55-120875、特開昭55-125872)

(6) 糖または改質した糖が結合されている担体 (例えば特開昭57-134164、特開昭58-133257、鎗淵化学リポソーパー)

(7) プリン塩基またはピリミジン塩基、或いは糖磷酸が結合されている多孔体 (例えば特開昭57-192560、特開昭58-61752、特開昭58-98142)

【0009】しかし、これら従来の物理化学的アフィニティー吸着材も、体外循環血液浄化療法による自己免疫疾患等の治療には充分とは言えず、血液適合性にも乏しいことから、さらに高い効率及び特異性で病因物質を除去することができ、また体液に対する悪影響の少ない浄化材が望まれている。

【0010】このような概念に基づいて開発された血液浄化材については、例えば、特開平1-158970という特許が開示されている。この特許によって開示されている血液浄化材は、重合度1~90のエチレンオキサイド骨格を有する親水性スパーサーを介し、被吸着物質と親和性を有する物質 (以下リガンドと略記する) として低分子有機化合物を水不溶性多孔質固体表面に固定し、これに直接血液を灌流して免疫グロブリンを吸着することを特徴としている。

【0011】親水性スパーサーの持つ意義のひとつとして、血液中の血球成分や、被吸着物質でない蛋白の付着を防止することが挙げられる。親水性スパーサーはその周辺に水を吸着している。このため吸着材表面は水の層に覆われ、この水の層が血球成分の付着を防いでいる (排除体積効果)。また、水の層を形成するスパーサーが運動することにより、さらに血球成分の付着は困難になり、付着した血球成分は脱離しやすくなる。また、凝固因子や補体の活性化が抑制されるといった利点を有する。すなわち、親水性スパーサーの導入によって血液適

合性の向上を図ることができる。

【0012】しかしながら、血液適合性向上の方法として親水性スパーサーの排除体積効果だけに頼る場合、スパーサーの重合度が90以下では充分とは言えず、特開平1-158970においては血液適合性向上のためアクリル酸誘導体のコーティングを行っている。このような操作は煩雑であるばかりでなく、毒性をもった物質の溶出を招く可能性も存在する。

【0013】親水性スパーサーの持つ第二の意義として、リガンドの運動性の上昇によって吸着能の向上が期待できることが挙げられる。被吸着物質が巨大分子である場合には、リガンドを直接固定しただけでは被吸着物質とリガンドの接近が困難であり、また一部で結合したとしても結合サイトの数が充分ではなく、容易に脱着してしまう可能性が大きい。親水性スパーサーを介在させることによって被吸着物質との接近が促進され、またリガンドの動きに融通性があるため周囲のリガンドが被吸着物質との結合に参加しやすく、このため結合サイトの多い強固な結合を生成することができる。

【0014】親水性スパーサーのこのような効果についても、特開平1-158970に記載されているように、コーティングを行ってしまえば半減するのを否めない。

【0015】特公平4-29396では、負電荷を有する不溶性担体に被吸着物質と結合可能な官能部位を有する有機化合物が結合していることを特徴とする血液浄化吸着材について開示されている。負電荷を有する表面が血液凝固や補体活性化を抑制する働きを持っている事実は1951年、Sawyerらによって発見され、その後多くの研究者らによって検討が加えられてきた (例えばSawyer et al., Amer. J. Surg., 114, 42, 1967、笠井ら., 人工臓器12, 327, 1983など)。特公平4-29396もこれらの研究と同じく、負電荷による血液適合性の向上を意図している。

【0016】しかし、特公平4-29396に開示されているように負電荷を有する担体を使用してさえも、特に繊維径の細い不織布を担体を選び、全血処理を行う場合には、十分な血球粘着抑制を実現するのは困難である。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記従来技術の欠点を解決し、リガンドの効果を十分に引き出して、良好な吸着能、吸着特性を有し、コーティング等の煩雑な操作を省略してなお充分な血液適合性を持った血液浄化吸着材を提供することにより、副作用がなく、自己の血液から病因物質を充分且つ選択的に除去し、あるいは血中の特定成分を選択的に吸着補集することのできる効果的な体外循環血液浄化療法を実現しようとしたものである。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明の血液浄化吸着材は、分子量400～40000のポリカルボン酸を導入した繊維径0.1～100 $\mu$ mの繊維から成る水不溶性不織布に、両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーを介して、被吸着物質と親和性を有する有機化合物を固定して成ることを特徴とする。本発明に使用される担体表面におけるポリカルボン酸由来のカルボキシル基含量は、10～10<sup>4</sup>  $\mu$ eq/gであることを特徴とする。本発明に使用される親水性スパーサーは、炭素数2～6のポリアルキレンオキサイド骨格を有する繰り返し単位から成り、重合度が2～400であって、両末端にアルデヒド基を有する化1に示した構造であることを特徴とする。

【0019】本発明の不織布型血液浄化吸着材に用いられる水不溶性不織布は、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメタクリル酸およびその誘導体或いはこれらの共重合体などの合成有機高分子化合物、セルロース、セファロース、デキストラン、キチン、キトサン等の天然有機高分子化合物、またはアシルセルロース、アシルセファロース等の改質天然有機高分子化合物であることが好ましい。これらの高分子化合物のうち、機械的強度、改質の容易さ等を考慮すると、ポリエステル、ポリエチレン、ポリスチレンおよびその誘導体或いはこれらの共重合体、エチレンービニルアルコール共重合体、あるいはセルロース、キトサンが望ましく、さらに好ましくはポリエステル、ポリエチレン、セルロースが望ましい。

【0020】本発明は担体として水不溶性不織布を使用することが特徴のひとつとなっている。本発明においては血液から血漿を分離することなく直接全血を灌流して血中の特定成分を分離することを目的としているため、吸着材と血液が接触する際の流通抵抗をいかに低く抑えるかが大きな問題となる。先願特許の多くは担体の形状として、粒子状、繊維状、中空糸状、膜状などさまざまなものを例示してはいるものの、実質的には粒子状担体を使用することを前提としていることが多い。しかしながら、粒子状担体では有効表面積を獲得するのは比較的容易だが、流通抵抗を低く抑えるには必ずしも適当であるとは言いがたい。このように圧損と有効表面積の両立を考えた場合、繊維状担体を使用することが好ましく、さらにその繊維状担体は不織布になっていることが好ましいとの結論に至った。

【0021】不織布型担体を形成する繊維の径は0.1～100 $\mu$ mの範囲にあることが必要であるが、好ましくは1～50 $\mu$ m、さらに好ましくは3～20 $\mu$ mであることが好ましい。これよりも繊維径が小さくなると血球の流通抵抗が大きくなり、繊維径が大きくなると有効表面積の減少を招く。繊維の形状については、細胞に与える損傷などから考えて、刺状の突起が存在することは

好ましくないが、有効表面積を増加させる目的で微小孔が存在することは好ましい。その平均孔径は20Å～3000Å、好ましくは100Å～2000Åである。これより平均孔径が小さいと表面積の実測値は大きくなるものの、被吸着物質が微小孔内部に到達できないため有効表面積の拡大にはならず、これより大きいと担体の強度低下を招く恐れがある。また、繊維にクリンプが存在することも、流通抵抗の低下や血液との接触効率の向上につながるため好ましい。本発明の不織布は0.6g/cm<sup>3</sup>以下、好ましくは0.4g/cm<sup>3</sup>以下のものであり、この下限は0.01g/cm<sup>3</sup>のものが好ましい。

【0022】本発明に用いられる分子量400～40000のポリカルボン酸としては、アクリル酸、ビニル安息香酸、メタクリル酸、マレイン酸、フマル酸などのカルボキシル基含有ビニル系化合物の重合体、あるいはカルボキシル基含有ビニル系化合物を共重成分とする共重合体；ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸などの酸性ポリアミノ酸、あるいはこれらを共重成分とする酸性共重合体；アルギン酸、ペクチン酸などの酸性多糖類などが挙げられる。また、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリ無水マレイン酸の加水分解物なども使用され得る。これらのポリカルボン酸のうち、導入の容易さや導入後の安定性、親水性などから、アクリル酸、ビニル安息香酸、メタクリル酸、マレイン酸、フマル酸などのカルボキシル基含有ビニル系化合物重合体が好ましく、さらに好ましくはポリアクリル酸、ポリメタクリル酸が好ましい。

【0023】本発明においてポリカルボン酸を担体に導入し、リガンドの固定化を行う意義は大きくわけて二つ挙げられる。第一は担体表面に負電荷を導入することで血液凝固や補体活性化を抑制し、血液適合性を向上させることである。血球は負に帯電しているため、負電荷を有する表面とは静電反発によって吸着が阻害され、凝血が起こりにくくなる。また、補体活性化のカスケードが負電荷素材のトラップによって阻害を受けるため、補体活性化抑制の効果も期待できる。

【0024】負電荷を付与するにはカルボキシル基のほかにスルホン酸基、リン酸基なども考えられるが、これら種々の負電荷を有する置換基について血液適合性を検討した結果、特に血球粘着についてはカルボキシル基を導入するのが最も好ましい結果となった。

【0025】また、低分子量のカルボキシル基含有化合物で担体表面に負電荷を導入した場合と比較して、分子量が400～40000の範囲のポリカルボン酸を水不溶性担体に導入した場合には、より良好な血液適合性、吸着性能を得ることができる。この理由として以下のようなことが考えられる。すなわち、血液などの液体中では、ポリカルボン酸の分子鎖の一部が担体表面から立ち上がって表面近傍に揺らぐように存在する可能性が期待

7

できる。この立ち上がったポリカルボン酸分子鎖は負電荷を有し、親水性であるため排除体積効果が期待でき、血液適合性の向上に寄与すると同時に、リガンドの運動性を上昇させることで吸着能の向上をももたらす。つまり、ポリカルボン酸の第二の効果として、親水性スパーサーとしての働きを期待できる。

【0026】単にカルボキシル基含有低分子量化合物の固定化や、負電荷を有する素材を担体に使用するだけでは上記のような排除体積効果は期待できず、充分な血液適合性を得るのは困難であり、リガンドの効果も充分に引き出されない。すなわち、良好な血液適合性や吸着性能を得るには、担体表面に負電荷を付与するのにあたり分子量400~40000のポリカルボン酸を用いることが不可欠である。このような観点から、より好ましいポリカルボン酸の分子量は500~20000であり、さらに好ましくは1000~10000であることが好ましい。これよりも分子量が小さいと充分な排除体積効果、リガンドの運動性は得られず、これ以上の分子量だと導入効率が低下するため好ましくない。

【0027】しかしながら、ポリカルボン酸だけでは親水性スパーサーとしての効果はいまだ充分であるとはいえず、より良好な吸着性能、血液適合性を得るためには非イオン性の親水性スパーサーが必要である。

【0028】本発明に使用される親水性スパーサーは化1に示された構造を有することが特徴である。その基本骨格としては、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコールなどが例示されるが、構造が化1に示した一般式に合致する限り、これらに限定されるものではない。

【0029】ポリカルボン酸を導入した不織布型担体に、両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーを介してリガンドを固定するのが本発明の要旨であるが、担体にポリカルボン酸を導入した後親水性スパーサーを導入し、さらにリガンドを固定する方法；担体にポリカルボン酸を導入した後、あらかじめリガンドを固定した親水性スパーサーを導入する方法；親水性スパーサーを固定したポリカルボン酸を担体導入した後リガンドを固定する方法；親水性スパーサーを介してリガンドを固定したポリカルボン酸を担体導入する方法、いずれを採用してもよく、最終的に得られる血液浄化吸着材に存在するポリカルボン酸由来のカルボキシル基含量が10~10<sup>4</sup> μeq/gであり、両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーを介してリガンドが固定されている限りその製造方法は制限を受けるものではない。

【0030】さらには、担体表面に導入したポリカルボン酸とは別個に、独立して親水性スパーサーを担体表面に導入し、この親水性スパーサーの片末端にリガンドを固定化するという方法も採用され得る。この場合、ポリカルボン酸の分子鎖は負電荷の付与と排除体積効果によって担体の血液適合性向上に貢献し、担体表面に導入さ

8

れた親水性スパーサーは排除体積効果によって血液適合性向上に貢献するとともに、リガンドの運動性向上に寄与する。つまり、ポリカルボン酸分子鎖と親水性スパーサーによって血液適合性向上とリガンドの運動性向上とが、ある程度役割分担されることになる。

【0031】本発明に使用される水不溶性不織布型担体へのポリカルボン酸は、使用中に遊離が認められない限り特に制限されるものではないが、化学反応による共有結合、イオン結合、電子線や紫外線の照射によるグラフト化などが好ましい。特に、不織布型担体の素材となるのがセルロースやキトサンなどの場合には化学反応による共有結合での固定化が好ましく、素材がポリエチレンやポリエステルなどの場合には電子線照射によるグラフト化が好ましい。

【0032】セルロース製の担体には、過沃素酸塩との反応で導入したアルデヒド基、モノクロル酢酸との反応で導入したカルボキシル基、無水コハク酸との反応で導入したカルボキシル基、塩化パラトルエンスルホニルとの反応で導入した活性エステルなどの活性置換基を足がかりとして利用し、数ステップの反応を経ることによって化学結合でポリカルボン酸を固定化することができる。

【0033】不織布型担体に電子線照射でポリアクリル酸を導入する場合、ポリアクリル酸を溶解することができ、揮発性である溶媒にポリアクリル酸を溶解し、この溶液を不織布型担体に塗布して乾燥した後、電子線を照射する方法が好ましい。揮発性の溶媒としては特に限定されるものではないが、水、メタノール、エタノール、塩化メチレン、クロロホルム、アセトン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、またはこれらの混合溶媒が好ましい。

【0034】しかし、この方法を用いてもポリカルボン酸の沸点が低い場合には、溶媒の乾燥工程中にポリカルボン酸の一部または全部が蒸発してしまい、グラフト量の制御が困難になる可能性がある。また、逆にポリカルボン酸の融点が高い場合、溶媒の乾燥後、ポリカルボン酸が固体として析出してしまうため不織布型担体との接触効率が低下してしまい、グラフト量が低下する可能性がある。

【0035】このような事態を回避して電子線照射によるポリカルボン酸のグラフト効率を向上させるには、塗布溶液中にポリカルボン酸を溶解できる高沸点の化合物を添加することが好ましい。このような高沸点化合物としては、特に限定されるものではないが、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン等の多価アルコール、およびこれらの脱水縮合物のうち重合度が10以下で、流動性を持っているものなどが好ましい。これら高沸点添加物の添加量はポリカルボン酸の重量に対して、1/10~10/1程度が好ましい。

【0036】高沸点化合物よりもさらに効果的にポリカ

10

20

30

40

50

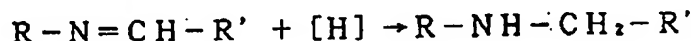
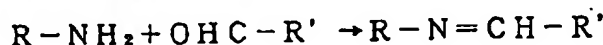


ルボン酸の導入を促進する添加物として、架橋性ビニル化合物があげられる。この架橋性ビニル化合物としては、メチレンビスアクリルアミド、トリメチロールプロパンジアクリレート、トリアリルイソシアヌレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、テトラメチロールメタンテトラアクリレートなどが例示され、より好ましくは下記化2に示したような化合物が好ましい。化\*



【0038】本発明に使用される水不溶性不織布型担体への、両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーの導入方法は共有結合、電子線照射によるグラフト化など、使用中に遊離が認められない限り特に制限されるものではないが、アルデヒド基の反応性を利用して共有結合によって固定するのが最も好ましい。

【0039】アルデヒド基は求核性置換基との反応でカ※



【0041】化3に示した通り、アルデヒド基の反応性を利用して固定化反応を行った場合、アルデヒド基の構造は改変される。従って本発明において、両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーを介して固定する、とはこのようにアルデヒド基の反応性を利用して固定化反応を行った結果、該親水性スパーサーの構造の一部が改変される場合をも包含する。

【0042】本発明の吸着材が対象とする被吸着物質は血液中の種々の特定物質であるが、より詳細には通常の免疫グロブリン(A、D、E、G、M)、抗DNA抗体、抗アセチルコリンレセプター抗体、抗血液型抗体、抗血小板抗体などの自己抗体；抗原・抗体複合物；エンドトキシン；リウマチ因子；LDL、VLDLなどのリポ蛋白；幹細胞、B細胞、T細胞、単球、マクロファージ、TIL（癌組織浸潤T細胞）などの血中細胞成分などが挙げられる。

【0043】固定するリガンドは被吸着物質によって適宜変える必要があるが、抗原抗体結合、補体結合、Fc結合等の生物学的相互作用を利用する種々の生物学的リガンド；または、疎水性アミノ酸、メチル化アルブミン、変性免疫グロブリン(IgG)、糖または改質した糖、プリン塩基、ピリミジン塩基、糖磷酸などの、静電結合、水素結合、ファンデルワールス力等物理的または化学的相互作用を利用した種々の物理化学的リガンドが考えられる。

【0044】リガンドの固定方法は、共有結合、物理的吸着、イオン結合、生化学的特異結合等特に制限されないが、血液中での結合安定性を考慮すると、アルデヒド

\*2に示した構造を有する添加物の添加量はポリカルボン酸の重量に対して1/50~50/1、好ましくは1/30~30/1である。

【0037】化2において、p=1~30の整数

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>は水素原子またはメチル基で、それぞれ同じもしくは異なってもよい。

【化2】

※カップリング反応をおこすことが知られている。この反応を利用して固定化を行うことが好ましい。アミノ基とアルデヒド基の反応について下記化3に示した。この反応による固定化法が比較的簡便で、生成物も比較的安定であり、推奨される。

【0040】

【化3】

基の反応性を利用した共有結合が好ましい。すなわち、リガンドに含まれる求核性置換基とアルデヒド基の反応を利用して、固定化する方法が推奨される。この場合、アミノ基、イミノ基、チオール基など比較的求核性の大きい置換基を利用するのが固定化率などの観点から好ましい。

【0045】本発明の血液浄化吸着材は、体液の導出入口を備えた適当な容器に充填することによって使用され得る。容器の材質はガラス、ステンレス、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等、特に制限されないが、滅菌等の取扱いを考慮すると、ポリプロピレンやポリカーボネートが好ましい。容器の形態についても特に制限されないが、両端を血液流入部、血液流出部とした円筒のカラム型、或いはシート状に成形した後、これを挟み込むような形態にしたものが適当であろう。

【0046】本発明の血液浄化吸着材は単独で使用してもよく、活性炭や多孔質ガラス、シリカゲルなど他の吸着材と混合、積層してもよい。また、リガンドとして2種以上の有機化合物を固定すること、異なったりガンドを固定化した吸着材を混合、積層して用いることも制限を受けるものではない。

【0047】

【実施例】以下、実施例を用いて本発明を説明する。

（実施例1）

（1）担体の合成

繊維径3、5μm、目付け45g/m<sup>2</sup>のポリエチレンテレフタレート（以下PETと略記する）製の不織布を



15 cm×12 cmの大きさに切断した(重量約810 mg)。このPET製不織布は改質に先立ち、アセトンで充分洗浄しておいた。分子量4000のポリアクリル酸(以下PAAと略記する)15 g、メチレンビスアクリルアミド(以下MBAAと略記する)5 g、グリセリン2 gをエタノール2 lに溶解し、この溶液にPET製不織布を浸漬して、PAAの塗布を行った。これを充分に乾燥させた後、片面につき5 Mradの線量で電子線(以下EBと略記する)を照射し、PET表面へのPAAのグラフト化を行った。水、メタノールで充分に洗浄し、PAA導入PET不織布(PET-PAA)を得た。得られたPET-PAAは120枚であった。このPET-PAAの酸含量を平沼産業製COMTITE101によって酸塩基滴定で定量したところ、0.32 meq/gであった。

【0048】(2) スペース固定用アミノ基の導入  
ガラス瓶に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(以下EDCと略記する)2.4 gを取り、pH4.5のリン酸緩衝液500 mlを加えて溶解させた。このガラス瓶にジエチレントリアミン3.2 gを加えてHClでpHを調節し、これに、上記で得たPET-PAA40枚を浸漬して室温で約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出し、充分に洗浄して、アミノ基導入PET-PAA(PET-PAA/NH<sub>2</sub>)を得た。酸塩基滴定で残存しているカルボキシル基を定量したところ、0.20 meq/gであった。また、導入されたアミノ基含量は0.11 meq/gであった。

【0049】(3) 末端アルデヒド基含有スペースの導入  
ガラス瓶に上記の操作で得たPET-PAA/NH<sub>2</sub>40枚(約32.5 g)を取った。両末端にアルデヒド基を有するポリエチレングリコール(ポリエチレングリコールの分子量は2000、以下この化合物をPEAと略記する)15 gをpH9.5の炭酸緩衝液650 mlに溶解した。この溶液をPET-PAA/NH<sub>2</sub>の入ったガラス瓶に注ぎ、PET-PAA/NH<sub>2</sub>が浸るようにした。室温で約14時間振盪して反応させた後、生成物を取り出し、イオン交換水で充分に洗浄した後減圧乾燥した。こうしてPEAを固定化したPET-PAA/NH<sub>2</sub>(PET-PAA-PEA)を得た。

【0050】(4) リガンドの固定化

上記の操作で合成した担体に、特発性血小板減少性紫斑病(以下ITPと略記する)の病因物質である、抗血小板抗体との親和性を有するオリゴペプチドをリガンドと

して固定化した。このオリゴペプチドはGlu-Thr-Arg-Asn-Val-Gly-Serの配列から成るヘプタペプチド(以下Pepと略記する)で、抗血小板抗体に対する免疫原性がエンザイムイムノアッセイ(以下ELISA法と略記する)により確認された。

【0051】上記のPep420 mgをガラス瓶に取り、pH9.5炭酸緩衝液150 mlを加えて溶解させた。この溶液に上記の操作で得たPET-PAA-PEA10枚(約8.4 g)を浸漬し、室温で約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出し充分に洗浄して、pH9.0の炭酸緩衝液150 mlの入ったビーカーに入れ、これに水素化ホウ素ナトリウム10 gを加えて室温でシッフ塩基の水素添加を行った。生成物を取りだし、充分に洗浄して目的物であるPep固定化PET製不織布PET-PAA-PEA-Pepを得た。反応液中の窒素含量をマイクロケルダール法で定量した値から算出したところ、Pepの固定化率は67%であった。

【0052】(5) リガンド固定化吸着材の吸着性能評価

上記PET-PAA-PEA-Pepを使用して評価用モジュールを作製し、その抗血小板抗体吸着性能を、ITP患者の血清を用いて評価した。図1に示したのが評価用モジュールの形態であるが、体液導入口5を有する漏斗型成型体3と、体液導出口6を有する漏斗型成型体3'との間、4の部分に不織布型血液浄化材を挟み込み、互いにネジで嵌合できるキャップ1と円筒2で締め付ける構造になっている。このモジュールを使用し、ITP患者の血清50 mlを37℃で30分間灌流した。

【0053】灌流前後の血清中の抗血小板抗体量をActa. Haemat., 66, 251, 1981に記されたELISA法で定量し、吸着率を算出した。結果は表1に示した通りであった。また、アルブミンの非特異吸着についても灌流前後のアルブミン量をアルブミンB-テストワコー(和光純薬工業製)で定量し、その値から吸着率を算出した。結果は表2に示した通りであった。さらに、灌流によるサンプルへの血球成分の粘着について、東亜医用電子製血球自動計数装置Sysmex F-800を用いて測定した。血球粘着については、灌流前の血液中の血球含量(白血球、血小板)に対する、灌流後の血液中の血球含量の占める割合(血球残存率)として算出し、表3に示した。

【0054】

【表1】

患者	A	B	C
実施例 1	52.0	56.7	49.2
実施例 2	52.1	57.0	53.2
比較例 1	2.8	3.9	3.4
比較例 2	7.2	6.4	7.3
比較例 3	43.3	48.5	39.9

【0055】

\* \* 【表2】

患者	A	B	C
実施例 1	0.3	0.3	0.5
実施例 2	0.8	0.4	0.5
比較例 1	12.8	14.5	13.4
比較例 2	7.4	6.9	7.4
比較例 2	1.5	1.6	1.2

【0056】

【表3】

	患者 A		患者 B		患者 C	
	白血球	血小板	白血球	血小板	白血球	血小板
実施例 1	64	99	65	99	62	98
実施例 2	94	99	93	99	91	99
比較例 1	62	86	63	88	63	85
比較例 2	80	88	79	89	78	87
比較例 3	56	98	61	96	58	98

## 【0057】〈実施例2〉

## (1) 担体の合成

繊維径8.3 $\mu$ m、目付け120g/m<sup>2</sup>のレーヨンの不織布を15cm $\times$ 12cmの大きさに切断した(重量約2.16g)。このレーヨン製不織布は改質に先立ち、アセトンで充分洗浄しておいた。過沃素酸ナトリウム40gをガラス瓶に取り、1規定-硫酸3.5lを加えて溶解した。このガラス瓶にレーヨン製不織布120枚を浸漬し、室温で約18時間振盪して反応させた。生成物をイオン交換水で充分洗浄し、減圧乾燥して、アルデヒド導入レーヨン不織布(CA)を得た。アルデヒド含量をオキシム法で定量したところ0.41meq/gであった。

【0058】上記で得たCA60枚をガラス瓶に取り、pH9.5の炭酸緩衝液2.0lを加えた。これにジエチレントリアミン20gを加え、室温で約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出してイオン交換水で充分に洗浄した後、pH9.0の炭酸緩衝液2.0lの入ったビーカーに入れ、これに水素化ホウ素ナトリウム100gを加えてシッフ塩基の水素添加を行った。こうしてアミノ基導入レーヨン不織布Cenを得た。酸塩基滴定でCenのアミノ基含量を定量したところ、0.38meq/gであった。

【0059】EDC1.6gをガラス瓶に取り、pH4.5のリン酸緩衝液300mlを加えて溶解させた。このガラス瓶にPAA20gを加えて30%水酸化ナトリウム水溶液でpHを調節し、これに、上記で得たCe

n10枚を浸漬して室温で約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出し、充分に洗浄して、PAA固定化レーヨン不織布C-PAAを得た。酸塩基滴定でC-PAAの酸含量を定量したところ、0.40meq/gであった。

## 【0060】(2) 末端アルデヒド基含有スパーサーの導入

ガラス瓶に上記の操作で得たC-PAA20枚(約44.0g)を取った。PEA14gを取り、pH9.5の炭酸緩衝液900mlに溶解した。この溶液をC-PAAの入ったガラス瓶に注ぎ、C-PAAが浸るようにした。室温で約14時間振盪して反応させた後、不織布を取り出し、イオン交換水で充分に洗浄した後減圧乾燥した。こうして、残存アミノ基との反応によってPEAを固定化したC-PAA(C-PAA-PEA)を得た。

## 【0061】(3) リガンドの固定化

上記で得たC-PAA-PEAに実施例1でPET-PAA-PEAにPepを導入したのと同様の方法でPepを固定化してC-PAA-PEA-Pepを得た。反応残液中の窒素含量をマイクロケルダール法で定量した値から算出したところ、Pepの固定化率は68%であった。

## 【0062】(4) リガンド固定化吸着材の吸着性能評価

実施例1と同様の方法でC-PAA-PEA-Pepの抗血小板抗体吸着性能、アルブミン非特異吸着、灌流後

の血球残存率について評価した。結果はそれぞれ表1、表2、表3に示した。

#### 【0063】〈比較例1〉

##### (1) 担体の合成

実施例2で得た、アルデヒド含量0.41meq/gのCAをそのまま担体として用いた。

##### 【0064】(2) リガンドの導入

CA10枚をガラス瓶に取り、pH9.5の炭酸緩衝液400mlを加えた。実施例1で使用したのと同じヘプタペプチドPepをあらかじめ少量のpH9.5炭酸緩衝液に溶解しておき、この溶液をCAの入った容器に加え、室温で約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出してイオン交換水で十分に洗浄した後、pH9.0の炭酸緩衝液400mlの入ったビーカーに入れ、これに水素化ホウ素ナトリウム20gを加えてシッフ塩基の水素添加を行った。生成物を取り出し、十分に洗浄して、目的物であるPep固定化レーヨン不織布C-Pepを得た。反応残液中の窒素含量をマイクロケルダール法で定量した値から算出したところ、Pepの固定化率は78%であった。

##### 【0065】(3) リガンド固定化吸着材の吸着性能評価

実施例1と同様の方法でC-Pepの抗血小板抗体吸着性能、アルブミン非特異吸着、濾流後の血球残存率について評価した。結果はそれぞれ表1、表2、表3に示した。

#### 【0066】〈比較例2〉

##### (1) 担体の合成

実施例2で得た、アルデヒド含量0.41meq/gのCA60枚をガラス瓶に取り、pH9.5の炭酸緩衝液2.5lを加えた。これにL-グルタミン酸20gを加え、室温で約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出してイオン交換水で十分に洗浄した後、pH9.0の炭酸緩衝液1.2lの入ったビーカーに入れ、これに水素化ホウ素ナトリウム100gを加えてシッフ塩基の水素添加を行った。こうしてカルボキシル基導入レーヨン不織布CGを得た。酸塩基滴定でCGのカルボキシル基含量を定量したところ、0.36meq/gであった。

##### 【0067】(2) リガンドの導入

EDC220mgをガラス瓶に取り、pH4.5のリン酸緩衝液400mlを加えて溶解した。このガラス瓶にPepを加えて溶解させた後CG10枚(約22.1g)を浸漬し、約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出し、十分に洗浄して、目的物であるPep固定化レーヨン不織布CG-Pepを得た。反応残液中の窒素含量をマイクロケルダール法で定量した値から算出したところ、Pepの固定化率は72%であった。

##### 【0068】(3) リガンド固定化吸着材の吸着性能評価

実施例1と同様の方法でCG-Pepの抗血小板抗体吸着性能、アルブミン非特異吸着、濾流後の血球残存率について評価した。結果はそれぞれ表1、表2、表3に示した。

#### 【0069】〈比較例3〉

##### (1) 担体の合成

実施例1で得たカルボキシル基含量0.32meq/gのPET-PAAをそのまま担体として用いた。

##### 【0070】(2) リガンドの固定化

EDC80mgをガラス瓶に取り、pH4.5のリン酸緩衝液150mlを加えて溶解した。このガラス瓶にPepを加えて溶解させた後PET-PAA10枚(約8.1g)を浸漬し、室温で約18時間振盪して反応させた。生成物を取り出し、十分に洗浄して、目的物であるPep固定化PET製不織布PET-PAA-Pepを得た。反応残液中の窒素含量をマイクロケルダール法で定量した値から算出したところ、Pepの固定化率は77%であった。

##### 【0071】(3) リガンド固定化吸着材の吸着性能評価

実施例1と同様の方法でPET-PAA-Pepの抗血小板抗体吸着性能、アルブミン非特異吸着、濾流後の血球残存率について評価した。結果はそれぞれ表1、表2、表3に示した。

【0072】上記の例から明らかなように、本発明の不織布型血液浄化吸着材は血中の特定成分(抗血小板抗体)を選択的、かつ簡便に除去できた。担体上にポリカルボン酸が存在しない場合(比較例1)では抗血小板抗体の吸着能が大きく劣っている。また、素材が同一である実施例2と比較した場合、アルブミンの非特異吸着や処理後の血球残存率についても本発明の吸着材に劣っている。また、担体上に低分子のカルボキシル基含有化合物(L-グルタミン酸)を導入した場合(比較例2)は、アルブミン非特異吸着や処理後の血球残存率については本発明の不織布型血液浄化吸着材と比較しても大きく劣ってはいないが、抗血小板抗体の吸着能はいまだ満足できるレベルではない。担体上にポリカルボン酸が存在し、親水性スパーサーを介さずにリガンドを固定した場合(比較例3)、比較例1、2と比べると血液適合性、吸着性能ともかなり改善されているが、いまだ充分とは言えない。

【0073】比較例1~3と比べ、分子量400~40000のポリカルボン酸を担体上に導入し、さらに両末端にアルデヒド基を有する親水性スパーサーを介してリガンドを固定した実施例のデータは、優れた血液適合性と吸着性能が両立されている。

#### 【0074】

【発明の効果】本発明の不織布型血液浄化吸着材は、分子量400~40000のポリカルボン酸が持つ負電荷と、非イオン性親水性スパーサーの働きにより、良好な

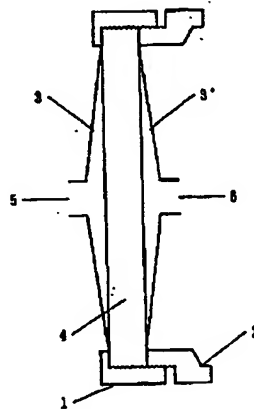
吸着性能と血液適合性を両立することができる。また、担体の形状が不織布型であるため全血を濾流した際の圧損を低く抑えることが可能となり、あらかじめ血液から血漿成分を分離して濾流するという煩雑な方法をとらず直接血液を濾流することによって十分な効果を期待することができる。このため、簡便な操作で、血液中の病因

物質の除去による種々の疾病の治療、或いはB細胞、T細胞等特定成分の選択的な分離に広く利用され得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例で使用される評価用モジュールの形態ついて図示したものである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 田中 昌和

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡

績株式会社総合研究所内